

**ANTITHROMBIN-III-BESTIMMUNG MIT
CHROMOGENEN SUBSTRATEN
METHODIK UND KLINIK**

Jürgen Zeller

1981

Aus der Medizinischen Klinik der Universität
München

Direktor: Professor Dr. med. E. Buchborn

Antithrombin-III-Bestimmung mit chromo-
genen Substraten
Methodik und Klinik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jürgen Zeller

aus

Biessenhofen-
Ebenhofen

Jahr

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. R. Marx

Mitberichterstatter: Professor Dr. E. Buchborn

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 1981



In
Dankbarkeit
meinen
Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553807_0012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Bisherige A-III-Bestimmungsmethoden	
Aufgabenstellung	2
Chromogenes Substrat S-2160	3
Gedanken zur Entwicklung	5
Antithrombin	
Literaturbeschreibung	8
A-III-Charakteristik	10
A-III-Matabolismus und Physiologie	12
Interaktion mit Thrombin	12
Interaktion mit Heparin	14
Methodik	
Geräte	18
Glaswaren	19
Reagentien	
S-2160	20
S-2238	20
Poolplasma	20
Thrombin	21
Antithrombin-III-Konzentrat	21
Protaminsulfat	22
Heparin	22
Puffer	22
Inhibitoren	23
Plasma	24
Defibrinieren	24
Verdünnung	24
Aufbewahrung	24

Versuchsbeschreibung	25
Nachteile der Methode	27
Vorteile der Methode	28
Erstellung einer Eichkurve aus Poolplasma	29
Reproduzierbarkeit	31
Abgrenzung eines Normalbereichs	33
Einteilung von Normalpersonen nach A-III-Aktivität	36
Einfluß des Lebensalters auf A-III-Aktivität	38
Thrombinhemmwirkung verschiedener Inhibitoren	40
Untersuchung über den Einfluß von Heparin auf die Steigerung vorgegebener A-III-Aktivitäten	43
Untersuchung über den Einfluß von A-III u. Heparin auf die A-III-Aktivität an einem Patientenplasma	46
Einfluß von A-III-Konzentrat auf A-III-Mangelplasma	47
Einfluß von Heparin auf ein pathologisches Plasma	48
Einfluß von Heparin auf A-III-Mangelplasma, das mit A-III-Konzentrat vorbehandelt wurde	50
Verlaufskontrolle der Therapie mit A-III-Konzentrat an einem Patienten mit A-III-Mangelsyndrom	53
Untersuchung über den Effekt von Protaminsulfat auf die A-III-Aktivität (mit und ohne Heparin)	56
Anwendung im chirurgisch-urologischen Bereich	58
Vergleichende Untersuchung der Thrombinzeit A-III-Aktivität und Heparinkonzentration im Plasma	63
Zusammenfassung	67
Autorenverzeichnis	69

Einleitung

Die bisherigen Methoden, die eine Bestimmung von Antithrombin-III zuließen, erfolgten entweder über Gerinnungsversuche, wobei Fibrinogen oder Plasma als Substrat dienten (6, 19), oder über die Technik der Immunelektrophorese (3, 15).

Im Jahre 1972 wurde erstmals von L. SVENDSEN, B. BLOMBÄCK u. P. OLSSON Versuche mit einem synthetischen Substrat über die Bestimmung von thrombinähnlichen Enzymen beschrieben (45).

Es handelt sich hierbei um ein Tripeptid (S - 2160 : Benzoyl - Phe - Val - Arg - p - nitroanilid), dem, nach Reaktion mit Thrombin, eine p - Nitroanilingrouppe abgespalten wird, die dann mit dem Spektralphotometer gemessen werden kann.

Dieselben Autoren veröffentlichten 1974 eine photometrische Bestimmungsmethode von Antithrombin mit eben diesem synthetischen Substrat S - 2160 (7).

Aufgabenstellung

Meine Aufgabe war es nun, diesen photometrischen Test der Antithrombin III - Bestimmung den Möglichkeiten unseres Gerinnungslabors anzupassen und ihn dahingehend zu modifizieren, daß er auch in die Routineuntersuchung eines Gerinnungslabors miteinbezogen werden könnte..

Dazu war es notwendig, den Test auf seine Reproduzierbarkeit hin zu überprüfen. Weiter sollten die Nachteile der Methode, ihre Fehlerquellen bzw. ihre Störfaktoren gefunden und untersucht und gegenüber den Vorteilen aufgerechnet werden.

So war es auch nur sinnvoll, den S - 2160 Test mit dem Immun-elektrophoresetest am selben Personenkollektiv zu vergleichen und die Ergebnisse zu bewerten.

Als nächste Aufgabe galt es dann, mit Hilfe dieses Testes verschiedene Fragestellungen zu lösen.

In in - vitro - Versuchen wurde die Hemmwirkung von mehreren Inhibitoren auf Thrombin gezeigt. Weiter wurde versucht, das Zusammenwirken von Thrombin, Heparin, A-III Konzentration und Protaminsulfat in bezug auf eine A-III Aktivitätsänderung darzustellen.

Schließlich sollte die Methode auch an Patientenplasmen getestet werden. So wurden unter anderem Krankheitsverläufe aus dem chirurgisch - intensiven, dem chirurgisch - urologischen und dem inneren Bereich beobachtet.

Im Laufe meiner Arbeit wurde von der Firma KABI ein neuer Heparin - Bestimmungstest herausgebracht, der sich ebenfalls eines chromogenen Substrates bedient.

Dieser KABI-Test und der S-2160 Test wurden daraufhin vergleichend an einem gemeinsamen Patientengut angewandt.

CHROMOGENES SUBSTRAT S - 2160

Die Erstbeschreibung chromogener Substrate in der Fachliteratur erfolgte im Jahre 1972 (45). Die Autoren L. SVENDSEN, B. BLÖMBÄCK, M. BLÖMBÄCK und P. OLSSON (Schweden) stellten verschiedene synthetische Substrate vor, die für eine Bestimmung von trypsin-ähnlichen Enzymen geeignet erschienen.

Eines dieser neuen Substrate ist das S - 2160.

Es handelt sich hierbei um ein Tripeptid folgender Struktur:



N- Benzoyl - L - phenylalanyl -L- valyl -L- arginin-p- nitro -
- anilid HCl

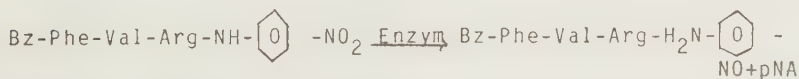
Als Vorlage für dieses Substrat diente die Struktur des Fibrinopeptids A. In der L-Form besitzt die Verbindung S-2160 eine hohe Affinität zu Thrombin.

Das Molekulargewicht des chromogenen Substrates S - 2160 beträgt 681,2 .

Löslichkeit: 1 mg in 1 ml H₂O bei Zimmertemperatur

Stabilität:	Pulver	bei 25° C	> 20 Monate
	1mM in H ₂ O	bei 5° C	> 20 Monate
	1mM in H ₂ O	bei 25° C	> 6 Monate

Das Prinzip der Methode mit chromogenen Verbindungen beruht auf der hydrolytischen Spaltung des Substrates (S - 2160) durch Proteasen.



Außer Thrombin reagieren auch andere proteolytische Enzyme wie Plasmin, Trypsin und Faktor Xa mit diesem Substrat.

Diese Tatsache muß man sich immer vor Augen halten, wenn die Thrombinreaktion auf das Substrat im Plasma gemessen werden soll.

Die Methode der Aktivitätsbestimmung beruht auf der unterschiedlichen Lichtabsorption von dem Spaltprodukt p - Nitroanilin (p - NA) und dem ursprünglichen Substrat.

Die Zunahme an p - NA ist proportional der Enzymaktivität und läßt sich an Hand der Extinktionsänderung mit dem Photometer bestimmen.

Zur Messung dient ein Spektralphotometer mit heizbarem Küvettenraum (37°C) (11).

Gedanken zur Entwicklung

Bei der Entwicklung von synthetischen chromogenen Amidsubstraten, die bei der Aktivitätsbestimmung in Systemen, die proteolytische Enzyme enthalten oder in denen solche entstehen oder verbraucht werden, zur Anwendung kommen sollen, muß bestimmten Anforderungen Rechnung getragen werden.

So müssen die chromogenen Substrate die Eigenschaft besitzen, durch Enzyme schnell gespalten zu werden und chromogene Produkte zu bilden, die hohe molare Extinktionskoeffizienten haben. Ferner sollten die gebildeten Produkte in einem Bereich absorbieren, in dem das ursprüngliche Substrat keine Eigenabsorption mehr aufweist. Ein weiteres Kriterium ist, daß die enzymatische Hydrolyse der Substrate dem MICHAELIS - MENTON - Gesetz folgt. Das setzt voraus, daß die beiden, bei der enzymatischen Hydrolyse gebildeten Produkte, das chromogene Aminderivat und das Acylderivat, weder aktivierend noch hemmend auf die Hydrolyse einwirken dürfen.

Die Löslichkeit der Substrate in Wasser sollte so hoch sein, um die Enzymbestimmung bei Substratsättigung ausführen zu können. Die benötigte Substratkonzentration ist abhängig vom K_m des jeweiligen Substrat - Enzym - Systems. Denn je kleiner K_m ist, desto weniger Substrat wird gebraucht, um Substratsättigung zu erreichen.

Die enzymatische Hydrolyse des Substrates ist ferner abhängig von der Temperatur, vom pH, von den im Puffer enthaltenen Ionen und deren Ionenstärke.

Die Enzymeinheiten werden - immer bei optimalen oder physiologischen Bedingungen - definiert als diejenige Menge Enzym, die $1 \mu\text{Mol}$ Substrat pro Minute umsetzt.

In jüngster Zeit wurden weitere Substrate mit hoher Empfindlichkeit auf einzelne Enzyme entwickelt.

Spezifität verfügbarer Substrate:

Bei Vorgabe von 1×10^{-11} mol Enzym in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml wurden folgende Aktivitäten bestimmt:

	THROMBIN (0,70 NIH-u)	TRYPSIN (1,4 NF)	FAKTOR Xa (0,75 Denson)	PLASMIN (0,025 CTA-u)
S-2160	0,140	0,170	0,003	0,002
S-2222	0,005	0,400	0,220	0,005
S-2238	0,480	0,270	0,016	0,003
S-2251	0,002	0,030	0,001	0,040

(33)

Während die Empfindlichkeit gegenüber Thrombin und Trypsin beim Substrat S - 2160 noch ziemlich ähnlich ist (45), konnte mit dem Substrat S - 2238 eine Substanz entwickelt werden, bei der die Spezifität auf Thrombin deutlich höher liegt.

	THROMBIN	PLASMIN	THRYPSIN	FAKTOR Xa
S-2238	400	130	170	150
S-2160	100	100	100	100

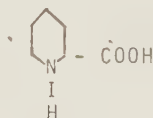
(12)

S-2238 zeigt gegenüber dem Substrat S-2160 eine etwa vierfach höhere Spezifität auf Thrombin.

Es handelt sich hierbei um eine Verbindung mit einem MG von 625,6 und folgender Struktur:

H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl

Pip: Pípecolin



Löslichkeit: 40 mMol/l in H₂O
10 mMol/l in Tris Puffer (pH 8,3)

Stabilität: Pulver > 1 Jahr
Lösung > 6 Monate (1mMol/l in H₂O) (12)

Als Ausblick auf die Zukunft sei noch erwähnt, daß es das Ziel der Forschung ist, mit Hilfe chromogener Substanzen die Bestimmung von Thrombin, Antithrombin III, Faktor X, Plasmin, Kallikrein etc., die bisher weitgehend Speziallabors vorbehalten ist, automatisieren zu können, und damit in der Früherkennung und Diagnostik von Blutungskrankheiten einen Schritt voranzukommen.

Antithrombin

Literaturbeschreibung:

Der Begriff Antithrombin wurde von P. MORAWITZ (29) im Jahre 1905 eingeführt und als eine Substanz definiert, die sich in strömendem Blut befindet und eine hemmende Wirkung auf Thrombin ausübt.

Acht Jahre später hat F.W. WEYMOUTH (49) die Anwesenheit diese Antithrombins dafür verantwortlich gemacht, daß Thrombin aus dem spontan gerinnenden Blut rasch verschwindet und im Serum nicht mehr nachweisbar ist. Dabei soll dieses Antithrombin mit Thrombin unter Bildung eines inaktiven Komplexes reagieren, den er als Metathrombin bezeichnet hat (36).

Als die Nachweismethoden empfindlicher und die Materialien besser wurden, konnten verschiedene Antithrombine unterschieden werden.

Im Jahre 1943 gingen T. ASTRUP und S. DARLING (4) daran, zwischen einem Faktor, der Thrombin progressiv inaktiviert und einem, der zusammen mit Heparin als Sofortinhibitor reagiert, zu unterscheiden.

1947 wurde von W.H. SEEGERs die Eigenschaft des Fibrins gezeigt, sich an Thrombin zu adsorbieren und dessen gerinnungsaktive Wirkung zu neutralisieren.

Schließlich wurde von W.H. SEEGERs und Mitarbeitern 1952 ein weiteres Antithrombin beschrieben (41, 43). Diese vier verschiedenen Antithrombine werden heute im allgemeinen nach W.H. SEEGERs Nomenklatur mit den Nummern I - IV versehen.

Von E.A. LOELIGER und J.F.P.H. HERS (22) wurde 1958 ein Antithrombin V beschrieben. Im Jahre 1959 führten S. NIEWIAROWSKI

und Mitarbeiter ein Antithrombin VI, ein Fibrinogenbruchstück, ein. Diese Antithrombine kommen unter normalen Umständen nicht in meßbaren Mengen im Blut vor.

Durch die Untersuchungen von U. ABILDGAARD (1) und N. HEIMBURGER (18) wissen wir heute, daß es sich beim Heparincofaktor (Antithrombin II) und beim Progressivantithrombin (Antithrombin III) um ein und dasselbe Molekül handelt. Lediglich durch Anwendung unterschiedlicher Meßmethoden erscheint es uns einmals als Heparincofaktor und dann wieder als Progressivantithrombin (36).

Antithrombin I	=	Fibrin, adsorbiert von Thrombin, neutralisiert dessen gerinnungsaktive Wirkung
Antithrombin II	=	Cofaktor zur Heparinwirkung, Protein, Sofortinhibitor
Antithrombin III	=	Progressivinhibitor, α -Globulin MG: 68000, Wirkung durch Heparin katalysiert
Antithrombin IV	=	ähnlich AT III, inaktiviert von Thrombin, das während des Gerinnungsprozesses aus Prothrombin gebildet wurde. (A IV wird von W.H. SEEGER'S Gruppe postuliert, G. SOKAL (44) konnte seine Existenz nicht bestätigen)
Antithrombin V	=	γ -Globulin, Sofortinhibitor wird durch Protaminsulfat nicht neutralisiert. Vorkommen: bei rheumatischen Gelenkentzündungen
Antithrombin VI	=	Fibrin - bzw. Fibrinogenbruchstücke - verhindern die Polymerisation des Fibrinogens

A III - Charakteristik

Antithrombin ist ein Einzelketten-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 68000. Es setzt sich zusammen aus 425 Aminosäuren mit 3 Disulfidbrücken (Cys 3- Cys 127, Cys 21 - Cys 95, Cys 238 - Cys 240) und 4 Oligosaccharid-seitenketten in ASN 96, 134, 154 und 191 (34). Die Oligosaccharide enthalten die Kohlenhydrate: Gal 0,77 %, Man. 1,49 %, N-ac-glucosamin 1,68 %, Sialinsäure 1,88 % in einer molaren Relation von 2:4:4:3 (10). Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,11.



Modell des Antithrombin-Moleküls (34)

Antithrombin wandert in der Papierelektrophorese mit α - und β -Globulinen (21). In der Immunelektrophorese kann es als Niederschlag in der α_2 -Region nachgewiesen werden (15). Durch Ausschütteln in Chloroform, Äther und Alkohol geht die Antithrombin III-Aktivität im Plasma oder Serum verloren. Ebenso ist ein Aktivitätsverlust nach Dialyse in destilliertem Wasser zu verzeichnen, jedoch bleibt die A III-Aktivität nach Dialyse in physiologischer Kochsalzlösung konstant.

Bei Dialyse mit zunehmender Ca^{++} -Konz. steigt die Aktivität an (N. HEIMBURGER: pers. Mitteilung DAB - Tagung Frankfurt Febr. 1978).

Die Antithrombin III - Aktivität in Plasma bleibt bei $- 25^{\circ} \text{C}$ für einige Monate konstant, bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ jedoch nur noch zwischen 4 und 12 Wochen. Erhitzen auf 56°C läßt bei einer Dauer bis zu 10 Minuten keinen Aktivitätsverlust erkennen (19). Bei höheren Temperaturen, ($0 - 65^{\circ} \text{C}$), beginnt dann Antithrombin III rasch an Aktivität zu verlieren (24).

Bei optimalen Reaktionsbedingungen für die A-III-Aktivität liegen bei einer Temperatur von $35 - 40^{\circ} \text{C}$ und bei einem pH von 6,8 - 8,5 (24, 28).

A III - Metabolismus + Physiologie

Es gilt als wahrscheinlich, daß Antithrombin III in der Leber gebildet wird. Diese Vermutung stützt sich auf zahlreiche Untersuchungsergebnisse, die bei Fällen mit schwerer Leberparenchymschäden gesammelt wurden (13, 19).

Beim Menschen und bei vielen Säugetieren wird Antithrombin III nicht nur in der Blutbahn, sondern auch im Lymphsystem gefunden. Auch im Pleuraexsudat und Ascites konnte A-III nachgewiesen werden (50). Kürzlich wurde auch in Endothelzellkulturen von Nabelschnurvenen eine AT-III Synthese nachgewiesen (8).

Als Halbwertszeit geben A. HENSEN und E.A. LOELIGER ca. 4 Tage an (19). Andere Autoren geben als halbe Verweildauer in der Zirkulation des Blutes beim Kaninchen 60 Stunden an (48). D. COLLEN und Mitarbeiter schätzen die biologische Halbwertszeit von humanem radiomaklierten AT III auf $2,83 \pm 0,26$ Tage (9).

Interaktion mit Thrombin

Thrombin ist ein Enzym, das Fibrinogen in ein Fibrinomer und in die Fibrinpeptide A und B, die von der α - bzw. β -Kette des Fibrinogens abgetrennt werden, spaltet. Die Fibrinomere lagern sich in einem rein physikalischen Prozeß zum harnstofflöslichen Fibrinpolymer aneinander, das dann durch den mittels Thrombin und Calcium aktivierten fibrinstabilisierenden Faktor (F XIII) zum harnstoffunlöslichen Gemisch umgewandelt wird.

In einem Milieu, das frei von Antithrombin III ist, genügen relativ kleine Mengen von Thrombin für die Umwandlung relativ großer Mengen von Fibrinogen, weil Thrombin, nachdem es mit Fibrinogen reagiert hat, wieder für die Reaktion zur Verfügung steht. Die Reaktion beendet sich jedoch selbst, weil das Polymerisationsprodukt des Fibrinmonomers = Fibrin (Antithrombin I) Thrombin adsorbiert und somit dessen gerinnungs-

aktive Wirkung aufhebt.

Die Anlagerung von Thrombin an Fibrin ist reversibel. Antithrombin ist in der Lage, mit an Fibrin adsorbiertem Thrombin quantitativ zu reagieren (19). Beide, Thrombin und Antithrombin, werden bei dieser Reaktion verbraucht, was für die Komplexbildung spricht.

Die Thrombininaktivierung durch Antithrombin III verläuft langsam und erreicht nach etwa 60 - 120 Min. einen von der angewandten Antithrombin III - Menge abhängigen Grenzwert. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist stark pH-abhängig und besitzt ein ausgeprägtes Maximum bei pH 8,5 (25). Die gebildete Thrombin-Antithrombin III Verbindung ist praktisch undissoziiert. Durch Elektrophorese bei pH zwischen 4,0 - 10,0 ist sie nicht zu trennen. Das durch Antithrombin III inaktivierte Thrombin kann durch eine Erhöhung der Ionenkonzentration nicht reaktiviert werden.

Der Angriffspunkt des Antithrombins am Thrombin erfolgt wahrscheinlich am aktiven Zentrum des Enzyms (25).

Die Komplexbildung zwischen Protease und Antithrombin soll so zustandekommen, daß die Protease eine Peptinbindung im Antithrombinmolekül spaltet und zwischen der dabei freigesetzten Carboxylgruppe des Antithrombins und der aktiven Seringruppe der Protease eine Esterbindung gebildet wird (36) (39).

Unter physiologischen Bedingungen liegt Antithrombin III im Vergleich zu Thrombin im Überschuß vor.

Thrombin, das während eines Gerinnungsprozesses im Normalblut gebildet wird, verbraucht nicht mehr als 25 % des vorhandenen Antithrombins.

Ohne Heparin ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Antithrombin und Thrombin so gering, daß die in vivo aktivierten Thrombinmoleküle eine weit größere Chance haben, mit ihrem

Substrat zu reagieren, als mit Antithrombin als Inhibitor. Sobald aber Heparin verfügbar ist, um mit Antithrombin und Thrombin zu reagieren, wird die Reaktion so beschleunigt, daß die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung durch Antithrombin weit größer ist als die Umsetzung des Substrates (36).

Dem Antithrombin III fällt nicht nur die Rolle des Thrombininhibitors zu, sondern es greift auch an anderen Stellen der Gerinnungskaskade ein, z.B. inaktiviert es langsam den Faktor XI a, Faktor X a, Faktor VII a, und wahrscheinlich auch den Faktor IX a. Diese Reaktionen werden durch Heparin verstärkt (37, 32, 16).

A-III inaktiviert Thrombin normalerweise als Progressivinhibitor; diese Reaktion kann jedoch durch Heparin, das Antithrombin III in einen Sofortinhibitor umwandelt stark beschleunigt werden.

In Abwesenheit von Heparin werden 1 - 3 Stunden benötigt, um A-III und Thrombin in Sättigung zu bringen (30).

Nach einer Inkubationszeit von 5 - 8 Minuten kann in Abwesenheit von Heparin nur eine anfängliche Hemmwirkung gemessen werden. In Gegenwart von Heparin läuft die Inaktivierung des Thrombins in nahezu 30 Sekunden ab und die gesamte Hemmaktivität kann bestimmt werden (30).

Interaktion mit Heparin

Wie bereits erwähnt, wird durch Zusatz von Heparin zum Antithrombin-Thrombin-Gemisch die Geschwindigkeit der Thrombininaktivierung in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration gesteigert. Dabei bleibt die Thrombinmenge gleich, die maximal vom vorhandenen Antithrombin inaktiviert werden kann.

Das pH-Maximum der Thrombininaktivierung wird bei Gegenwart von Heparin zum Neutralpunkt hin verschoben, sodaß die Inaktivierung bei pH 7,5 mit der größten Geschwindigkeit abläuft (25).

Falls die durch Heparin beschleunigte Thrombininaktivierung durch Bildung eines inaktiven Thrombin-Heparin-Antithrombin-Komplexes zustande kommt, wäre zu erwarten, daß bei dieser Reaktion das Heparin verbraucht wird und sich die Konzentration des freien Heparins verringert. Wie jedoch F. MARKWARDT und P. WALSMANN (25) in elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches zeigen konnten, wird das Heparin nicht verbraucht, sondern kann nach Abschluß der Reaktion quantitativ und in seiner Aktivität unverändert zurückgewonnen werden. Wird z.B. einem Thrombin, Antithrombin und Heparin enthaltenen Ansatz nach Abschluß der Inaktivierungsreaktion wiederum Thrombin hinzugefügt, so zeigt sich auch hierbei, daß das Heparin seine volle Wirksamkeit beibehalten hat und die Reaktion des erneut zugegebenen Thrombins mit dem Antithrombin in gleicher Weise beschleunigt. Eine Verringerung des Heparins hätte sich durch eine Herabsetzung der Inaktivierungsgeschwindigkeit bemerkbar machen müssen(25).

Nach F. MARKWARDT und P. WALSMANN bilden Heparin und Thrombin eine lockere, leicht dissoziierende Additionsverbindung, wodurch es in gereinigten Gerinnungssystemen zu einer geringen reversiblen Hemmung der Thrombinaktivität kommt.

(Bei Gegenwart von Plasma (= Anwesenheit von Antithrombin) verursacht das Heparin eine mehrfach stärkere und irreversible Hemmung des Thrombins. Versuche zur Isolierung der Substanz aus Rinderplasma, durch deren Mitwirkung das Heparin zum wirksamen Thrombinhemmstoff wird, zeigten, daß diese mit dem Antithrombin des Blutes identisch ist. Auf Grund dieser Versuche verneinen F. MARKWARDT und P. WALSMANN die Existenz eines speziellen Heparin Co-Faktors.

Der Mechanismus der Antithrombinreaktion im Blut ist letztlich noch nicht ganz geklärt. Er wird beeinflusst von mehr oder weniger spezifischen Faktoren, jedoch konnten die hypothetischen Proteinfaktoren noch nicht isoliert werden. Das ist auch der Grund dafür, daß die Ergebnisse mehrerer Autoren immer wieder voneinander abweichen.

Während beschrieben wird, daß sich Thrombin an Fibrin absorbiert und damit an Wirksamkeit verliert, und durch Heparin diese Adsorption bis zu einem gewissen Grad beschleunigt wird, (W.H. SEEGER 40, 20) konnte B. BLOMBACK et al. (6) zeigen, daß auch Fibrinogen bei niedrigen Heparinkonzentrationen wie ein Antithrombin reagiert. Dieser Effekt scheint an Fibrinogen gebunden zu sein und nicht an Fibrin oder Fibrinopeptide. Bei niedrigen Heparinkonzentrationen scheint sich die Ladung des Fibrinogens derart zu ändern, daß mehr Thrombin adsorbiert werden kann. Bei höheren Heparinkonzentrationen verschwindet dieser Inhibitoreffekt. Hier reagiert das Heparin dann mit einem anderen Antithrombin. B. BLOMBACK (6) postuliert hierfür den "Heparin-Co-Faktor". Die Co-Faktor-Aktivität ist im Serum und im hitzedefibrinierten Plasma nachweisbar. Die Inaktivierung des Thrombins durch den Co-Faktor und Heparin erfolgt in Form einer nicht kompetitiven Hemmung. Die Co-Faktor-Aktivität ist nur schwach von der Thrombin-konzentration abhängig.

Das Plasma besitzt als Antithrombinaktivität den "progressiven" Antithrombin Effekt (=Antithrombin III). Nach genügend langer Inkubationszeit vermag Plasma mehr Thrombin zu inaktivieren als Heparin in hohen Konzentrationen (6). Die Erklärung hierfür mag darin liegen, daß einige der Reaktionsmechanismen zur Thrombinhemmung in Gegenwart hoher Heparinkonzentrationen blockiert werden (24, 42).

Während F. MARKWARDT und P. WALSMANN (25) der Meinung sind, daß es sich bei "progressiv-Antithrombin" und Heparin-Co-Faktor um ein und dasselbe handelt, und die Heparinwirkung so erklären, daß dadurch die Affinität des Antithrombins zum Thrombin erhöht wird, postulieren T. ASTRUP und S. DARLING (4) wie auch S.W. LYTTLETON (23), daß es sich beim "progressiv-Antithrombin" und dem Heparin-Co-Faktor um zwei ganz verschiedene Substanzen handelt.

Die physiologische Aufgabe der Antithrombinaktivität im Plasma liegt in der Aufrechterhaltung der Fließeigenschaften des Blutes durch die Inaktivierung der Gerinnungsproteasen, vor allem der Faktoren Xa und Thrombin.

Die Gerinnungsproteasen zirkulieren im Blut in Form ihrer inaktiven Vorstufen und werden physiologisch nur bei Bedarf an bestimmten Orten zu bestimmten Zeiten aktiviert eingesetzt. Antithrombin hat die Aufgabe, sowohl die zur falschen Zeit am falschen Ort aktivierten Gerinnungsproteasen, als auch die richtig eingesetzten Gerinnungsproteasen nach Erfüllung ihrer biologischen Aufgabe zu inaktivieren (36).

Thrombin kann sich entweder mit Fibrinogen oder mit Antithrombin verbinden, unter physiologischen Bedingungen jedoch läuft die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion schneller ab, als die Inaktivierung des Thrombins durch Antithrombin. Erst bei Anwesenheit von Heparin wird die Affinität von Thrombin zum Antithrombin derart erhöht und dadurch die Thrombin-Antithrombin-Reaktion so stark beschleunigt, daß Antithrombin zu einem schnellwirkenden Thrombinhemmstoff wird (25, 35).

Methodik

Geräte:

- Photometer: Gitterspektralphotometer 220/110 V/50 Hz
Modell DB - G
Fa. Beckmann USA
Der Küvettenraum wurde über Siliconschläuche
durch das Wasserbad auf 37⁰ C beheizt.
Fa. Eppendorf
- Streifenblatt-
schreiber: Kompensationsstreifenblattschreiber
10 Zoll Schreibbreite für lineare und
lineare-logarithmische Meßwertaufzeichnung.
Fa. Beckmann
- Zentrifuge: P 6 K
Fa. Phywe
- Ultraschallbad
Wasserbad: Plastikgefäß. mit dest. Wasser gefüllt,
elektrisch beheizt, Temperaturregulation
erfolgt durch Thermostaten,
gleichmäßige Temperierung wird durch eine
elektrische Umwälzpumpe mit Rührwerk
gewährleistet.
Typ: JULABO: Exatherm U 3 electronic

Glaswaren:

Erlenmeyerkolben verschiedener Größe

Bechergläser

Pipetten: Außlauf 2 ml

5 ml

Dewargefäß

Reagenzgläser: Einmalreagenzgläser, Plastik 10 ml

" 2 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Verschuß, Plastik 1,5 ml

Eppendorf-Pipetten: Kolbenpipette mit fest eingestelltem Hub. Sie dient zum Pipettieren im Mikroliterbereich

10 μ l - 1000 μ l

(1 μ l = 0,001 ml)

Küvetten: Einmal-Mikro-Küvetten, Polystyrol

1 x 1 x 4,5 cm

Semi-Mikro-Küvetten: Polystyrol

10 x 10 x 45 mm ca 1,6 ml

Stoppuhr

Fließpapier

Plastikrührer

Reagentien:

Synthetisches Substrat:

S - 2160: N-Benzoyl-L-Phe-L-Val-L-Arg-pNA * HCl

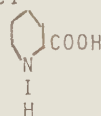
Hersteller: AB Bofors Nobel Division, Mölndal,
(Schweden)

Das Pulver wird in destilliertem Wasser gelöst
in einer Konzentration von 0,68 mg/ml H₂O (1mM)
mit Hilfe eines Ultraschallbades (ca. 3 Std.).
Die Aufbewahrung erfolgt in Einmalplastikreagenz-
gläsern, vor Licht geschützt durch Alufolie,
im Kühlschrank bei + 4⁰ C.

Während des Versuches wurde es bei Zimmer-
temperatur aufbewahrt.

S - 2238: H-D-Phe-Pip-Arg-pNa-2 HCl

Pip: Pipecolin



Hersteller: s.o.

Das Pulver wird in destilliertem Wasser in einer
Konzentration von 0,63 mg/ml H₂O (= 1 mM) gelöst.

Aufbewahrung: s.o.

Poolplasma: Plasmagemisch von mindest. 15 gesunden Personen
gewonnen
bezogen von der Blutbank München, Beethovenplatz

Thrombin:

Test-Thrombin: 60 NIH - Einheiten

Hersteller: Behringwerke

Das Pulver wird mit destilliertem Wasser (+ 4⁰ C) in Einmal-Plastikreagenzgläsern (vorgekühlt bei + 4⁰ C) gelöst in einer Konzentration von ca. 15 NIH-E/ml.

Aufbewahrt wurde es in Portionen zu 1 ml bzw. 2 ml bei -50⁰ C. Stabilität ca. 3 Monate.

Für den Versuch werden die tiefgefrorenen Portionen in Wasser von Zimmertemperatur angetaut und anschließend in Eiswasser aufbewahrt.

Antithrombin III-Konzentrat:

Antithrombin III-Konzentrat mit Aktivität von 80 - 100 ml
Humanplasma
OP. 161271

Hersteller: Behringwerke

Das Pulver wurde mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Stammlösung:

1 ml enthält dann eine Aktivität von 8 - 10 ml Humanplasma Portionen zu 1 ml (Aktivität von 8 - 10 ml Humanplasma) werden bei - 50⁰ C eingefroren. (= Stammlösung)

Während eines Versuches wird die A-III-Stammlösung weiter verdünnt und in Eiswasser aufbewahrt.

Protaminsulfat:

1 %ige Lösung: 1 ml $\hat{=}$ 10 mg Protaminsulfat

Hersteller: Fa. Novo

Protaminsulfat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung
verdünnt auf 0,1 %: 1 ml $\hat{=}$ 1 mg Protaminsulfat

Aufbewahrung bei Zimmertemperatur

Heparin:

Liquemin ^R 5 ml $\hat{=}$ 25000 U.S.P.E. Heparin

Hersteller: Fa. Hoffmann-La Roche

Verdünnung erfolgt mit physiologischer Kochsalzlösung
auf 5,4,3,2,1 E / ml

Aufbewahrung bei Zimmertemperatur

Physiologische Kochsalzlösung:

Hersteller: Krankenhausapotheke Uni-München

Puffer:

Tris-imidazol-Puffer:

pH 8,2

0,025 M

0,15 (Ionenstärke)

Herstellung:

I 1T 0,1 M Imidazol in 0,1 M HCl

1T 0,1 M Tris in 0,1 M HCl

II 1T 0,1 M Imidazol in 0,1 M NaCl

1T 0,1 M Tris in 0,1 M NaCl

Lösung I und II werden so gemischt, daß sich der gewünschte pH (8,2) einstellt = Lösung III.

1 Teil der Lösung III und 1 Teil 0,2 M NaCl ergeben die Lösung von 0,15 Ionenstärke und 0,025 N Ionenkonzentration.

Tris-imidazol-citrat-Puffer:

pH 8,2

0,025 M

Inhibitoren: (Prof. Fritz: Inst. für Klin.Chemie, München)

Hirudin

Antipain

Kallikreininhibitor
(Aprotinin, Trasylol^R)

Verdünnungen werden mit

physiologischer Kochsalzlösung

Bdellin A

angefertigt.

Bdellin B

Seeanemoneninhibitor

Die Aufbewahrung während des Versuches erfolgt in
Eiswasser.

Plasma:

Zur Verwendung kommt Venenblut, das mit Na-citrat im Verhältnis 9 Teile Blut + 1 Teil Citrat ungerinnbar gemacht wurde. Bei ca. 3000 U/min wird 20 Minuten lang zentrifugiert.

Der Plasmaüberstand wird abpipettiert und weiter verarbeitet, oder in kleinen Portionen zu ca. 1 ml in 10 ml Plastikröhrchen bei -45°C tiefgefroren.

Defibrinieren:

Die tiefgefrorenen Plasmaproben werden bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut.

Anschließend werden die Proben 10 Minuten lang im 56°C heißen Wasserbad erhitzt, dann 5 Minuten lang in Eiswasser abgekühlt, darauf 20 Minuten lang bei 5000 U/min. zentrifugiert.

Der klare Überstand wird abpipettiert und weiterverwendet.

Verdünnung:

Die defibrinierte Plasmaprobe wird mit Tris-imidazol-citrat-Puffer im Verhältnis 1:10 = 1 Teil Plasma und 9 Teile Puffer verdünnt.

Bei allen Versuchen, bei denen Plasma zum Einsatz kommt, ist dieses mit Tris-imidazol-citrat-Puffer verdünnte und defibrinierte Plasma gemeint.

Aufbewahrung:

Die so bereiteten Plasmaproben werden, wenn sie nicht weiterverarbeitet werden, bei -45°C eingefroren. Während des Versuches werden sie bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Versuchsbeschreibung

Der BECKMANN-Gitterspectralphotometer besitzt zwei Strahlengänge. Er ist in der Lage, zwei Werte gleichzeitig zu messen und davon die Differenz der Extinktion anzuzeigen.

Diese Extinktion wird mit dem 10 Zoll-Streifenblattschreiber aufgezeichnet bei einem Papiervorschub von 2,5 Zoll pro Minute.

Da es sich bei den Versuchen um Aktivitätsmessungen handelt, wurde die anfängliche Extinktionsänderung pro Zeiteinheit bestimmt = $\Delta E/\text{min}$.

Bestimmung des Blindwertes T - To

T = 0,1 ml Thrombin
2,15 ml Tris-imidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

To = 2,25 ml Tris-imidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

100 μl Thrombin werden mit einer Eppendorfpipette (100 μl) in eine Makroküvette hineingegeben. Dabei ist darauf zu achten, daß die Pipettenspitze zuerst ein- bis zweimal mit der Thrombinlösung durchgespült wird, jedoch so, daß keine durch Adhäsionskräfte bedingte Tropfen an der Innenwand der Pipettenspitze haften bleiben. Dann werden die 100 μl aufgezogen und schließlich langsam und vollständig, d.h. ohne daß ein Tropfen an der Pipettenspitze zurückbleibt, auf den Boden der Küvette pipettiert. Nun werden 2,15 ml des im Wasserbad auf 40° C erwärmten Puffers mit einer 5 ml Auslaufpipette hinzugegeben.

In einer zweiten Küvette (To) werden 2,25 ml desselben Puffers vorgegeben.

Mit einer 250 μl Eppendorfpipette werden nun in beiden Küvetten je 250 μl S-2160 hinzugegeben. Anschließend wird sofort mit

einem Plastikrührer jeder Küvetteninhalt kräftig durchmischt, wobei darauf zu achten ist, daß keine Schaumbildung entsteht, unverzüglich nach dem Mischen wird im Photometer die Differenz der Extinktion beider Küvetten ($T - T_0$) bestimmt.

Bestimmung des Probewertes $P - P_0$

P - 0,1 ml Thrombin
 0,25 ml Plasma
 1,9 ml Tris-imidazol-Puffer
 0,25 ml S - 2160

P_0 - 0,25 ml Plasma
 2,0 ml Tris-imidazol-Puffer
 0,25 ml S - 2160

Es werden mit der gleichen Sorgfalt 100 μ l Thrombin in eine Küvette vorgegeben. Hierzu werden 250 μ l Plasma pipettiert, durch Schütteln gemischt und anschließend 4 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Inzwischen kann in die zweite Küvette (P_0) 0,25 ml Plasma hineingegeben werden. Nach 4 Minuten werden vom Puffer 1,9 ml in (P) bzw. 2,0 ml in (P_0) hinzugefügt, gleich anschließend je 250 μ l Substrat S-2160 in jede Küvette.

Wiederum wird mit dem Plastikrührer kräftig gemischt und sofort anschließend im Photometer gemessen.

Aus der Differenz der beiden Messungen

$$(T - T_0) \quad - \quad (P - P_0)$$

wird ein Wert bestimmt, dem mit Hilfe einer Eichkurve eine bestimmte Antithrombin III-Aktivität zugeordnet werden kann (7).

Nachteile der Methode

Wie oben schon kurz erwähnt, erfordert die Methode ein exaktes Arbeiten.

Besonders ist darauf zu achten, daß beim Pipettieren von Thrombin, Antithrombin III und Plasma mit Eppendorfpipetten beim Ausdrücken keine Tropfen an den Kunststoffspitzen haften bleiben.

In Übereinstimmung mit A.N. TEIEN und M.L. & U. ABILDGAARD et. . al. (46) konnte gezeigt werden, daß hohe Bilirubinwerte ($> 6\text{mg } \%$) den Extinktionswert beeinflussen und falsche, überhöhte Antithrombin-III-Aktivitäten ergeben.

Weiter ist darauf zu achten, daß bei der Blutabnahme und Aufbewahrung keine Heparinverunreinigungen möglich sind. Denn schon ganz geringe Heparinkonzentrationen ziehen eine relativ große Antithrombin III-Aktivitätserhöhung nach sich.

Nach den einzelnen Arbeitsschritten, speziell nach Zugabe des Substrates S-2160, muß der Küvetteninhalt mit einem Plastikrührer gut gemischt werden, damit das Substrat möglichst gleichmäßig auf den Küvetteninhalt verteilt wird, weil sonst die Gefahr einer Schlierenbildung besteht, was einen ungenauen Extinktionsverlauf bedeuten würde.

Während der Messung im Photometer dürfen weder Zentrifuge noch die Wasserbadpumpe in Betrieb sein, da sowohl der Photometer wie auch der angeschlossene Schreiber gegenüber Vibrationen empfindlich sind und ein exaktes Ablesen der Meßwerte nicht mehr zulassen.

Einer größeren Verbreiterung der photometrischen Antithrombin III-Bestimmung mit S-2160 steht bisher noch der hohe Preis entgegen ($25\text{ mg} = 250,-\text{ DM}$).

Vorteile der Methode

Die Methoden zur Antithrombin III Bestimmung beruhten entweder auf der Messung der Gerinnungszeit, wobei Fibrinogen als Substrat diente, oder erfolgten immunologisch durch eine Radial-Immundiffusion (MANCINI) bzw. Elektro-Immundiffusion (LAURELL) unter Verwendung eines Antiserums gegen Antithrombin III.

Die neue Methode, die sich eines chromogenen Substrates bedient, hat gegenüber der vorhergenannten einige Vorteile. Sie mißt nämlich in einem höheren Maße als bisher möglich die Kinetik der Interaktion zwischen Thrombin und Antithrombin.

Gleichwohl konnten U. ABILDGAARD et al. zeigen, daß eine positive Korrelation zwischen den drei Bestimmungsmethoden besteht (2, 15). Daraus darf konsequenterweise geschlossen werden, daß alle drei Methoden dasselbe Antithrombin im Plasma messen.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß photometrisch gemessen wird, was den Test für Labors interessant macht, die keine großen Erfahrungen mit den wesentlich komplizierteren Methoden der Gerinnungstechnik und Immundiffusion haben.

Diese Testmethode läßt es auch zu, eine größere Anzahl von Bestimmungen in kürzerer Zeit zu machen.

Als Ausblick auf die Zukunft eröffnet die photometrische Antithrombin III Bestimmung die Möglichkeit einer Automatisierung und eines Einsatzes im Screening-Verfahren (7, 31, 5).

Erstellung einer Eichkurve aus Poolplasma

Zur Bereitung einer Eichkurve wurde Poolplasma benötigt. Zur Verwendung kam Plasma, das von mindestens 15 gesunden Personen gewonnen wurde. Bezogen haben wir das Poolplasma von der Blutbank München, Beethovenplatz.

Die Defibrinierung erfolgte nach der schon beschriebenen Art und Weise.

Das so bereitete Plasma wurde nun verdünnt wie folgt:

1 Teil Plasma + 4 Teile Trisimidazolcitrat-Puffer
- Plasmaverdünnung 1:5 -
dies entspricht einem Antithrombin III-Aktivitäts-
gehalt von 200 Prozent.

Dieses 200 Prozentplasma wurde weiterverdünnt:

1 Teil (200 Prozentplasma) + 1 Teil Trisimidazolcitrat
- Plasmaverdünnung 1:10 -
dies entspricht einem Antithrombin III-Gehalt von
100 %.

Das 100 Prozentplasma wurde weiterverdünnt:

1 Teil (100 Prozentplasma) + 1 Teil Trisimidazolcitrat-
Puffer
- Plasmaverdünnung 1:20 -
Dies entspricht einem Antithrombin III-Gehalt von
50 %.

Weiterverdünnung:

1 Teil (50 Prozentplasma) + 1 Teil Trisimidazolcitrat-
Puffer
- Plasmaverdünnung 1:40 -
Dies entspricht einem Antithrombin III-Gehalt von
25 %.

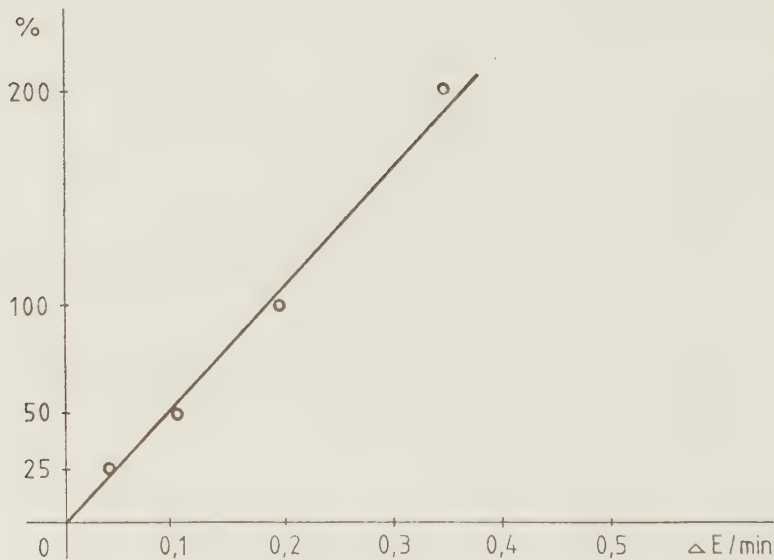
Die so erhaltenen Verdünnungen werden zu je 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgeteilt, eingefroren und bei -45°C aufbewahrt.

Die Haltbarkeit liegt so bei mindestens 6 Monaten.

Für jede einzelne Verdünnung (= Plasma 25 %, 50 %, 100 %, 200 %) werden die Extinktionen P-Po bestimmt und vom Leerwert T-To abgezogen.

Die Extinktionswerte werden in einem Diagramm gegen die A-III Plasmakonzentrationen aufgetragen.

A-III Aktivität



Reproduzierbarkeit:

Um zu gewährleisten, daß unter möglichst gleichen Bedingungen gearbeitet werden kann, d.h., um den Verdünnungsfaktor klein zu halten, ist es von Vorteil, die Thrombinlösung und die Plasma-Konzentrationen für die Eichkurve in Chargen herzustellen, die für ca. 30 Arbeitstage ausreichen.

Nachweis der Reproduzierbarkeit anhand eines pathologischen Plasmas

Die Antithrombin III-Aktivität eines Plasmas mit bekanntem Antithrombin III-Mangelsyndrom wurde an sieben verschiedenen Arbeitstagen bestimmt.

Datum	A-III-Aktivität in %
10. 8.	55
16. 8.	57
7. 9.	55
8. 9.	60
23. 9.	68
7.10.	65
14.10.	63
19.11.	67
10.12.	62
5. 1.	65
6. 1.	68
21. 1.	57
1. 2.	67
14. 2.	55
15. 2.	57
4. 3.	65

	n	=	17	
Mittelwert	$\bar{x}$	=	61	
Standardabw.	s	=	5	
Variations-				
Koeffizient	v	=	8,35 %	
S_1 - Bereich	56	=	66 %	
S_2 - Bereich	51	=	71 %	
niedrigster ermittelter Wert				55 %
höchster ermittelter Wert				68 %

Wie noch zu zeigen sein wird, liegt dieser Wert $\bar{x} = 61$ % bzw. $S_2 = 51 - 71$ % deutlich unter dem Normbereich und ist somit Ausdruck eines pathologischen Befundes.
(A-III-Mangelsyndrom)

Abgrenzung eines Normalbereiches

Die Bestimmung der Antithrombin-III-Aktivität erfolgte an Plasmen gesunder Normalpersonen.

Patient Nr.	Alter	Geschlecht	A-III-Aktivität in %
1	23	♀	95
2	25	♂	115
3	33	"	97
4	36	"	107
5	21	"	82
6	22	"	93
7	22	"	104
8	30	"	100
9	31	"	107
10	32	"	89
11	36	"	104
12	37	"	95
13	43	"	97
14	43	"	100
15	44	"	104
16	22	"	110
17	22	"	123
18	23	"	88
19	23	"	112
20	25	"	100
21	26	"	90
22	28	"	115
23	28	"	97
24	29	"	89
25	32	♀	110

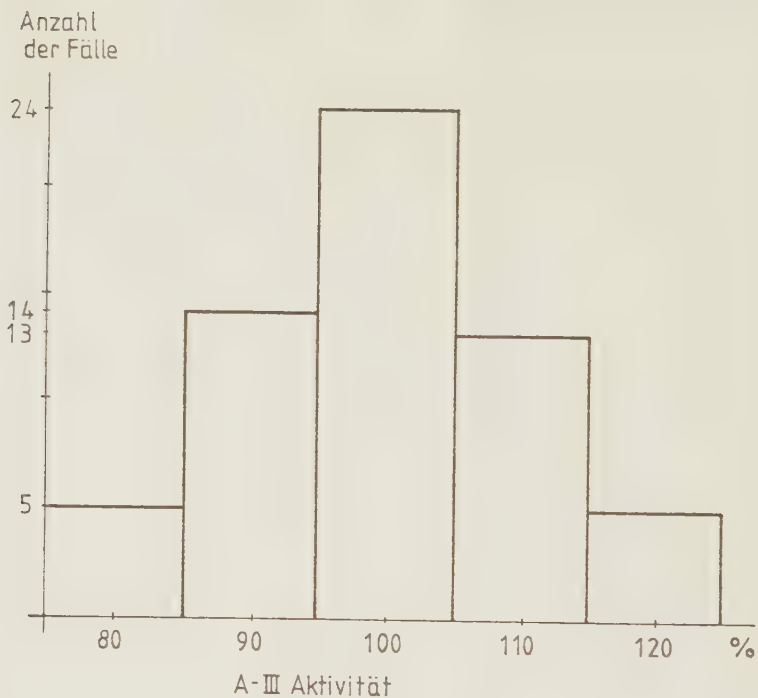
Patient	Alter	Geschlecht	A-III-Aktivität in %	Methode
26	32	♀	85	S - 2160
27	32	♂	112	
28	34	"	107	
29	34	"	85	
30	35	"	85	
31	36	"	83	
32	36	"	110	
33	36	"	120	
34	36	"	100	
35	36	"	100	
36	37	♀	110	
37	37	♂	87	
38	37	"	110	
39	37	"	82	
40	37	"	102	
41	38	"	87	
42	38	"	120	
43	39	"	108	
44	39	"	100	
45	39	"	84	
46	39	"	93	S - 2238
47	41	"	108	
48	43	"	78	
49	45	"	103	
50	47	"	102	
51	52	♂	99	
52	67	♀	90	
53	20	♀	95	
54	20	"	100	
55	26	"	140	
56	29	"	112	
57	20	♂	90	
58	35	"	95	
59	33	"	105	
60	38	"	92	
61	30	"	95	
62	27	"	95	

	n	$=$	62
	$\bar{x}$	$=$	99,87
Standardabweichung	s	$=$	11,73
Variationskoef.	V	$=$	11,74

S_1 - Bereich $=$ 88 - 112 %

S_2 - Bereich $=$ 76 - 124 %

Einteilung von Normalpersonen nach A-III Aktivität



Anzahl von Normalpersonen	A-III-Aktivitätsbereich
5	85 %
14	85 % - 95 %
24	95 % - 105 %
13	105 % - 115 %
5	115 % - 125 %

Die Antithrombin III-Aktivitätsbestimmung an einem Kollektiv von 62 gesunden Patienten ergibt einen Normalbereich von 76 % - 124 %.

Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit den Werten anderer Autoren.

Autor	Normalbereich der Antithrombin III-Aktivität in %	Anzahl der untersuchten Personen
Hurn et al.	73,0 - 119,0	47
Sokal et al.	85,0 - 115,0	50
Witte u. Dirnberger	70,0 - 125,0	20
Eggstein u. Mammen	80,0 - 110,0	?
Hoene et al.	100,3 $\pm$ 15,3	47

Antithrombin III-Aktivität bei Normalpersonen

(Tabelle aus A. HENSEN und E.A. LOELLIGER
= Antithrombin III (19))

Einfluß des Lebensalters auf die A-III-Aktivität

Die Werte der Antithrombin III-Aktivitäten werden nach Altersgruppen geordnet und die Mittelwerte bestimmt.

Altersgruppe (Jahre)	$\bar{x}$	n	s
20 - 29	102,8	20	14,2
30 - 39	99,0	33	10,9
40 - 49	98,8	7	9,81

A-III-Aktivitäten verschiedener Altersgruppen

$\bar{x}$ = Mittelwert der Antithrombin III-Aktivität

n = Anzahl der untersuchten Personen

s = Standardabweichung

In Übereinstimmung mit A. HENSEN und E.A. LOELLIGER (19) konnte gezeigt werden, daß in der Altersgruppe zwischen 20 und 60 Jahren keine altersspezifische Änderung der Antithrombin III-Aktivität zu beobachten ist, wohingegen nach A. HENSEN und E.A. LOELLIGER im Kindesalter (Altersgruppe 2 - 13) und im Greisenalter (Altersgruppe 80 - 89) eine deutliche Veränderung der Antithrombin III-Aktivität zu verzeichnen ist.

Alter (Jahre)	$\bar{x}$	n	s
2 - 13	117,0	25	13,3
20 - 29	102,3	31	10,0
30 - 39	102,3	20	10,7
40 - 49	106,0	10	11,5
50 - 59	97,0	10	11,0
80 - 89	93,5	26	11,5

A-III-Aktivitäten verschiedener Altersgruppen

Tabelle nach A. HENSEN und E.A. LOELLIGER (19)

$\bar{x}$ = Mittelwert der A-III-Aktivitäten

n = Anzahl der Personen

S = Standardabweichung

Thrombinhemmwirkung verschiedener Inhibitoren

Mit Hilfe des Substrates S-2160 wurde die Hemmwirkung von einigen Thrombininhibitoren dargestellt.

Versuchsanordnung:

$$(T - T_0) - (P - P_0)$$

T : 0,1 ml Thrombin
2,15 ml Trisimidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

T₀ : 2,25 ml Trisimidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

P : 0,1 ml Thrombin
0,05 ml Inhibitor*  4 Min. inkubiert in
2,1 ml Trisimidazol Eiswasser
0,25 ml S - 2160

P₀ : 0,05 ml Inhibitor *
2,20 ml Trisimidazol
0,25 ml S - 2160

* Lösung des Inhibitors in physiologischer Kochsalz-
lösung

Zur Untersuchung kommen die Inhibitoren:

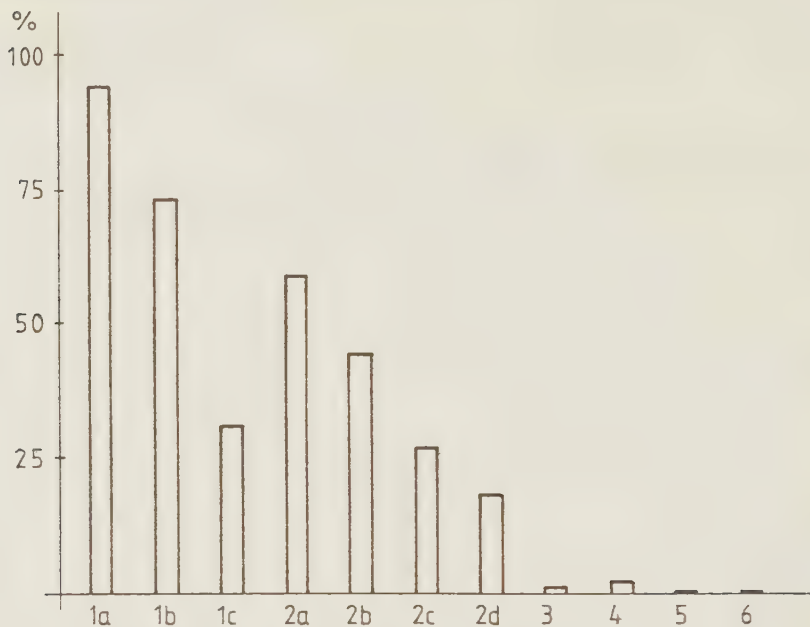
Hirudin
 Antipain
 Trasylol
 Bdellin A , B
 Seeanemonen-Inhibitor

Hemmwirkung der Inhibitoren

Hemmung des gesamten vorgegebenen Thrombins
 = 100 % Hemmung

Inhibitor		Konz. pro ml Ansatz	Hemmwirkung
1 a	Hirudin	0,4 μ g	94 %
b	"	0,04 μ g	73 %
c	"	0,02 μ g	31 %
2 a	Antipain	20 μ g	59 %
b	"	10 μ g	44 %
c	"	4 μ g	27 %
d	"	2 μ g	18 %
3	Trasylol	20 μ g	1 %
4	Bdellin A	20 μ g	2 %
5	Bdellin B	20 μ g	---
6	Seeanemone	20 μ g	---

Hemmwirkung



Thrombin - Hemmung verschiedener Inhibitoren
(Bedeutung von 1a - 6 siehe vorige Tabelle)

Mit Hilfe von S - 2160 konnte sehr gut gezeigt werden, daß Hirudin eine sehr hohe Thrombinhemmwirkung besitzt. Sie ist bis zu 100fach stärker, als die von Antipain. Mit Trasylol, Bdeilin A und B sowie Seeanemonen-Inhibitor läßt sich dagegen keine Hemmwirkung mehr erzielen.

Untersuchung über den Einfluß von Heparin auf die
Steigerung vorgegebener A-III-Aktivitäten

Methode: (T - To) - (AH - AHo)

T : 0,1 ml Thrombin
2,15 ml Trisimidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

To : 2,25 ml Trisimidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

AH : 0,1 ml Thrombin
0,1 ml A III (Lösung verschiedener Konz.)^x
0,02 ml Heparin (")
2,03 ml Trisimidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

AHo : 0,1 ml A - III
0,02 ml Heparin
2,13 ml Trisimidazol-Puffer
0,25 ml S - 2160

^x = A - III + Heparin werden 20 Min. inkubiert,
dann das Gemisch mit Thrombin 4 Min. inkubiert.

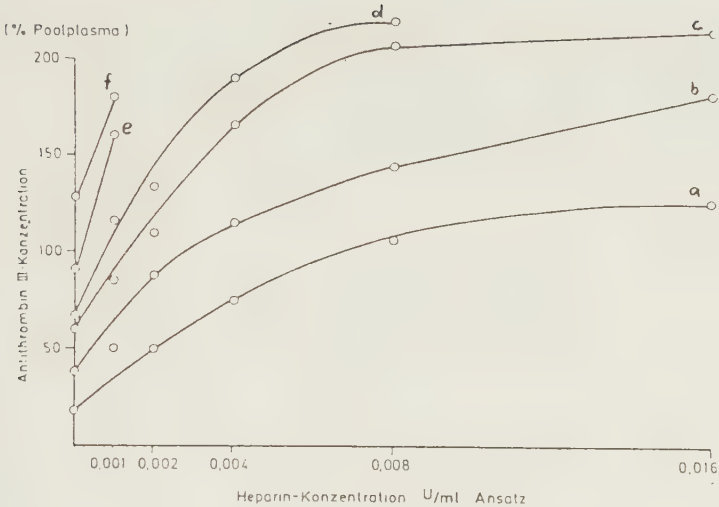
Der Versuch lief so ab, daß zu einer vorgegebenen, für den Versuch konstant gehaltenen Antitrombin-III-Aktivität Heparin in steigender Konzentration zugegeben werden und die daraus resultierende Antithrombin-III-Aktivitätssteigerung gemessen wurde.

Dann wurde eine neue, andere Antithrombin-III-Aktivität vorgegeben und ebenso, nach Zugabe von Heparin steigender Konzentration, die Antithrombin-III-Aktivitätsänderung bestimmt.

A-III-Konzentration pro ml Ansatz ≡ Aktivität von	Heparinkonzentration pro ml Ansatz						
	0	1xa ⁺	2xa	4xa	8xa	16xa	24xa
1,6x10 ⁻³ ml Humanplasma	18	50	60	75	107	127	157
2,5x10 ⁻³ ml Humanplasma	38	50	88	115	145	183	
3,3x10 ⁻³ ml Humanplasma	60	85	110	166	207	215	
4,0x10 ⁻³ ml Humanplasma	67	115	133	190	220		
4,4x10 ⁻³ ml Humanplasma	90	160					
5,0x10 ⁻³ ml Humanplasma	128	180					

A-III-Aktivität in % bezogen auf Normalplasma

+ a = 1x10⁻³ E



A-III-Aktivitätssteigerung in Abhängigkeit der Heparinkonz.

a:	A-III	($\hat{=}$ $1,6 \times 10^{-3}$ ml Humanpl.)	+	Hep.steigender Konz.		
b:	"	($\hat{=}$ $2,5 \times 10^{-3}$ ml "	)	+	"	"
c:	"	($\hat{=}$ $3,33 \times 10^{-3}$ ml "	)	+	"	"
d:	"	($\hat{=}$ $4,0 \times 10^{-3}$ ml "	)	+	"	"
e:	"	($\hat{=}$ $4,44 \times 10^{-3}$ ml "	)	+	"	"
f:	"	($\hat{=}$ $5,0 \times 10^{-3}$ ml "	)	+	"	"

Es konnte gezeigt werden, daß bereits relativ kleine Konzentrationen von Heparin genügen, um eine hohe Anstiegssteilheit zu erreichen, während hohe Dosen Heparin zwar absolut noch eine A-III-Aktivitätserhöhung erzielen können, insgesamt jedoch bewirken, daß die Kurven abflachen und sich einem Plateau nähern.

Untersuchung über den Einfluß von Antithrombin-III und Heparin auf die A-III-Aktivität an einem Patientenplasma

Zur Untersuchung kam der Einfluß von A-III-Konzentrat auf ein Patientenplasma, von Heparin auf dasselbe Plasma und der Einfluß von Heparin auf das Plasma, das mit Antithrombin III vorbehandelt worden war.

Methode: (T - To) - (OA - AO₀)

T : 0,1 ml Thrombin
 2,15 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

To : 2,25 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

OA : 0,1 ml Thrombin
 0,25 ml Plasma (A-III-Mangel) ^x
 0,05 ml A-III
 1,85 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

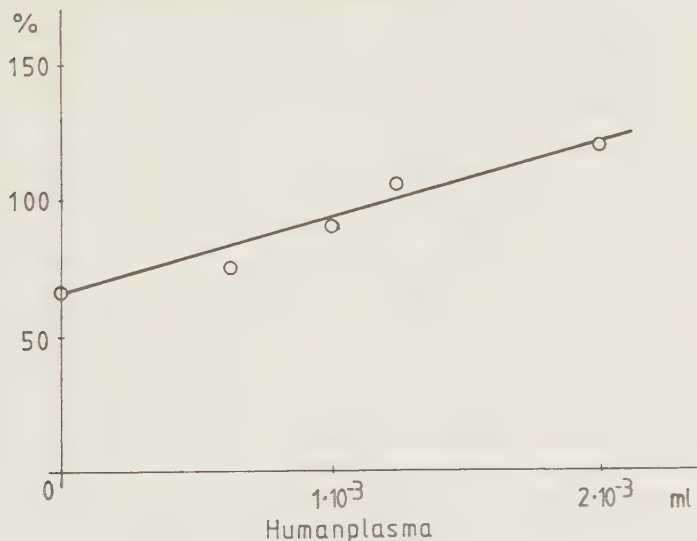
OA₀ : 0,25 ml Plasma
 0,05 ml A-III
 1,95 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

^x Plasma und A - III wurden gemischt,
dann 4 Min. mit Thrombin inkubiert.

Einfluß von A-III-Konzentrat auf A-III-Mangelplasma

Patienten- Plasma 0,1 ml/ml Ansatz	A-III-Konz. pro ml Ansatz, ≅ Aktivität von				
	0 ml Hum.pl.	$0,625 \times 10^{-3}$ ml Hum.pl.	1×10^{-3} ml Hum.pl.	$1,25 \times 10^{-3}$ ml Hum.pl.	2×10^{-3} ml Hum.
	65	75	90	105	120

A-III Aktivität bez. auf Normalplasma



A-III Aktivität in % in Abhängigkeit von A-III-Konzentratzugabe

Die Zugabe von A-III-Konzentrat zu einem pathologischen Plasma (A-III-Mangelsyndrom) läßt einen linearen Anstieg der A-III-Aktivität erkennen.

Einfluß von Heparin auf ein pathologisches Plasma

Methode: (T - To) - (OH - OH₀)

T : 0,1 ml Thrombin
 2,15 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

To : 2,25 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

OH : 0,1 ml Thrombin
 0,02 ml Heparin
 0,25 ml Plasma (A-III-Mangel)
 1,88 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

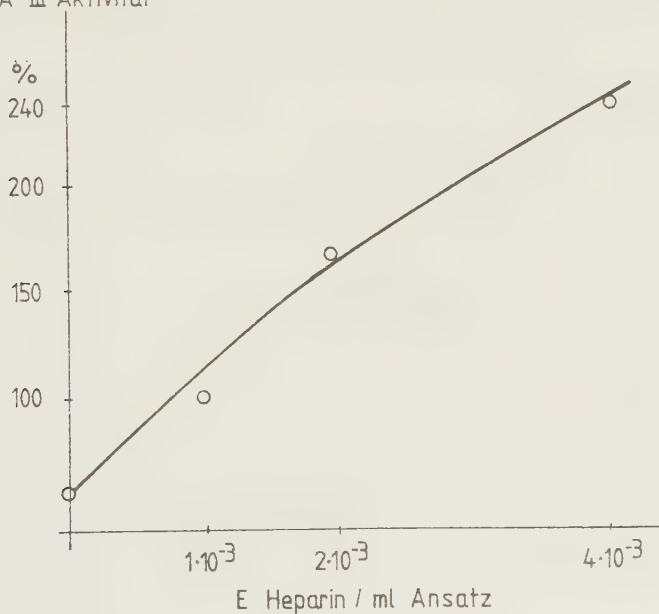
OH₀ : 0,02 ml Heparin
 0,25 ml Plasma
 1,98 ml Trisimidazol
 0,25 ml S - 2160

Heparin und Plasma werden 20 Min. inkubiert,
dann wird Thrombin zugegeben und 4 Min. inkubiert.

Einfluß von Heparin auf ein pathologisches Plasma

A-III- Aktivität in %	Heparinkonzentration pro ml Ansatz			
	0	1×10^{-3} E	2×10^{-3} E	4×10^{-3} E
	65	100	167	240

A-III Aktivität



A-III Aktivität in Abhängigkeit von der Heparinzugabe

Wie bei F. MARKWARDT und P. WALSMANN (25) konnte auch hier gezeigt werden, daß Heparin in niederen Konzentrationen eine starke Zunahme der A-III-Aktivität verursacht, bei höheren Konzentrationen aber die Steilheit der Kurve abflacht.

Einfluß von Heparin auf A-III-Mangelplasma, das
mit A-III-Konzentrat vorbehandelt wurde

Methode: (T - To) - (OAH - OAH₀)

T : 0,1 ml Thrombin
2,15 ml Trisimidazol
0,25 ml S - 2160

To : 2,25 ml Trisimidazol
0,25 ml S - 2160

OHA : 0,1 ml Thrombin
0,25 ml Plasma (A-III-Mangel)
0,05 ml A - III
0,02 ml Heparin
1,83 ml Trisimidazol
0,25 ml S - 2160

OHA₀ : 0,25 ml Plasma
0,05 ml A - III
0,02 ml Heparin
1,93 ml Trisimidazol
0,25 ml S - 2160

Plasma + A-III + Heparin werden 20 Min. inkubiert,
dann wird Thrombin zugegeben und 4 Min. inkubiert.

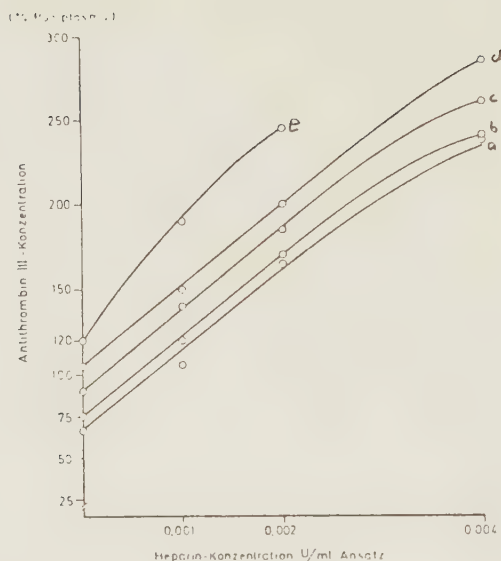
		A-III-Konzentration pro ml Ansatz $\hat{=}$ Aktivität von x ml Humanplasma				
		0	0,625x b	1,0xb	1,25xb	2,0xb
Heparin- Konzentr. pro ml Ansatz	0	65 ^x	75	90	105	120
	1×10^{-3} r	100	120	140	150	190
	2×10^{-3} E	167	170	185	200	245
	4×10^{-3} E	240	250	260	285	

A-III-Aktivität in Abhängigkeit von A-III + Heparin

^x Patientenplasma (A-III-Mangel) 0,01 ml/ml Ansatz

+ b = 1×10^{-3} und Humanplasma

Die Frage, die zu diesem Versuch Anlaß gab, war, ob es möglich ist, ein Plasma mit verminderter A-III-Aktivität durch Zugabe von A-III-Konzentrat und Heparin in physiologische Bereiche zu heben, wenn ja, ob potenziierende Effekte auftreten oder ob ein linearer Anstieg zu verzeichnen ist.



Antithrombin III-Bestimmung (Chromogen-Substrat S-2160)

- a: Plasma + Heparin
b: Plasma + A-III=(Akt. von $0,625 \times 10^{-3}$ ml Hum.pl.) + Heparin
c: Plasma + A-III=(Akt. von $1,0 \times 10^{-3}$ ml Hum.pl.) + Heparin
d: Plasma + A-III=(Akt. von $1,25 \times 10^{-3}$ ml Hum.pl.) + Heparin
e: Plasma + A-III=(Akt. von $2,0 \times 10^{-3}$ ml Hum.pl.) + Heparin

Wie zu zeigen war, laufen die Kurven weitgehend parallel, d.h.: die Zugabe von A-III-Konzentrat bewirkt nur eine Erhöhung der Ausgangsaktivität von A-III, jedoch keinen potenzierenden Effekt bei Zugabe von Heparin.

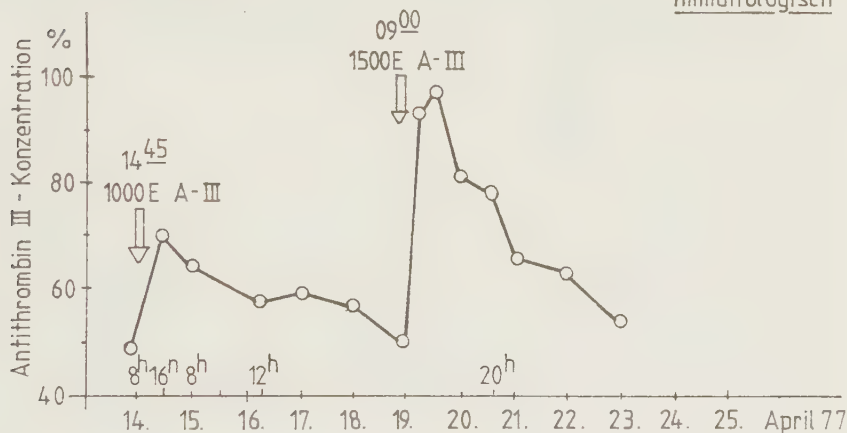
Verlaufskontrolle der Therapie mit A-III-Konzentrat an einem Patienten mit A-III-Mangelsyndrom

Erstmals wurde eine Therapie mit A-III-Konzentrat durchgeführt.

Ein Patient mit bekanntem A-III-Mangelsyndrom (ca. 65 % A-III-Aktivität) und Hämophilie A wurde mit dem neu entwickelten Antithrombin-III-Konzentrat der Firma Behringwerke (BIA-003/76) behandelt.

Der Verlauf der A-III-Aktivität über einige Tage wurde aufgezeichnet.

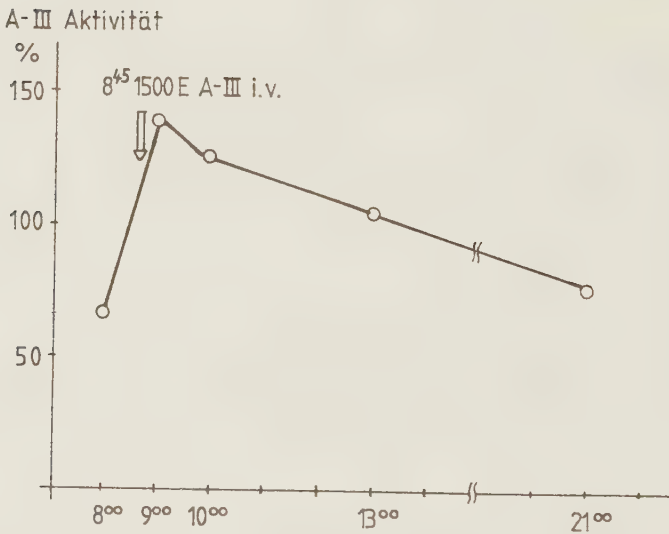
immunologisch



Deutlich ist nach der i.v. Injektion der rasche Anstieg der A-III-Aktivität zu erkennen.

Der Abfall der Aktivität erfolgt langsam und strebt nach ca. 4 Tagen wieder dem Ausgangswert zu.

Der A-III-Aktivitätsverlauf konnte mit beiden Methoden, photometrisch (chromogenes Substrat S-2160) und immunologisch, gleichermaßen nachgewiesen werden.



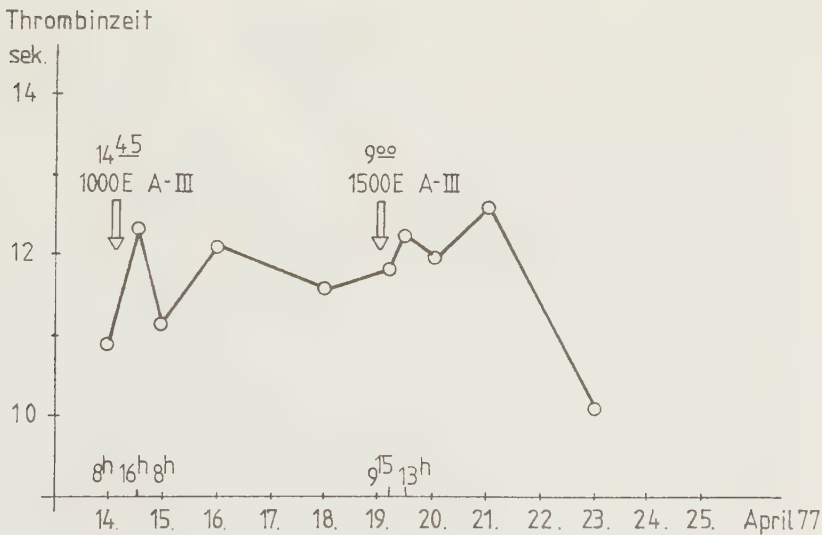
Auschnitte aus der Verlaufskontrolle eines Tages.
Gut zu erkennen der rasche Anstieg nach A-III-
Injektionen i.v. - verzögerter Abfall der
A-III-Aktivität

Durch die Therapie mit A-III-Konzentrat konnte die A-III-Aktivität, die ohne Therapie bei ca. 65 % liegt, in den physiologischen Bereich gehoben werden.

4 Tage nach der Injektion beginnen die Werte der A-III-Aktivität wieder auf den pathologischen Bereich < 76 % abzusinken.

Der photometrisch bestimmte und der immunologisch ermittelte Verlauf der A-III-Aktivität stimmen gut überein.

Interessant ist, daß bei der Aufzeichnung der Thrombinzeiten während der Verlaufskontrolle nach der Injektion der Anstieg der Thrombinzeit nur mäßig ausfällt, hier also nicht so deutlich der Einfluß der A-III-Therapie beobachtet werden kann.



Verlauf der Thrombinzeit unter der A-III Therapie

Untersuchung über den Effekt von Protaminsulfat auf die A-III-Aktivität (mit und ohne Heparinisierung)

Untersucht wurde Poolplasma, ein Patientenplasma mit festgestellter Mastzellretikulose und ein Patientenplasma nach Herzinfarkt und Heparinisierung.

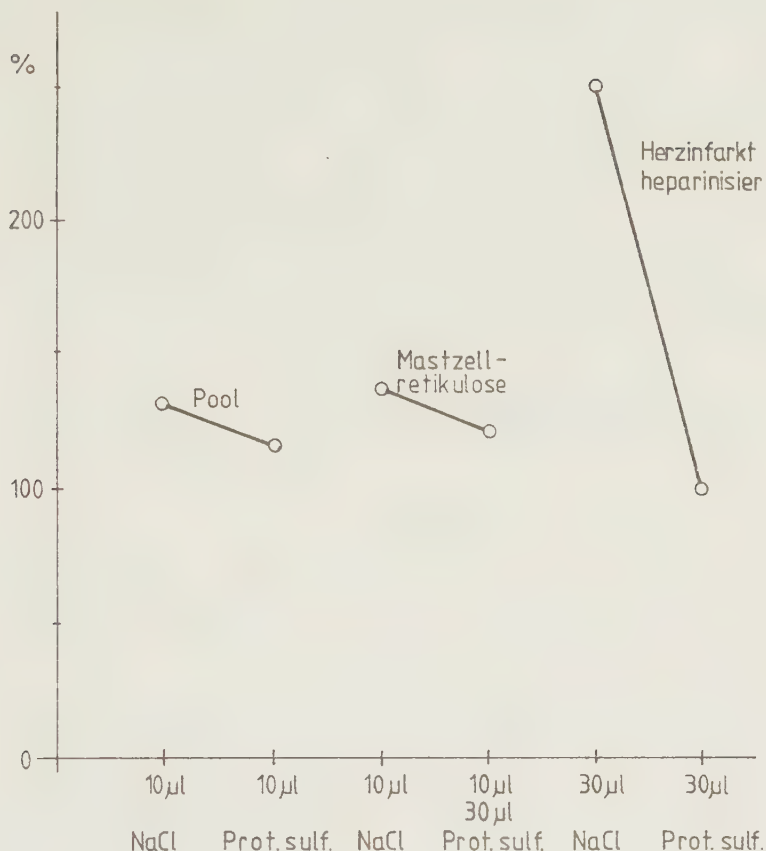
Methode:

0,5 ml defibriniertes, unverdünntes Plasma wird mit Protaminsulfat (10 μ l, 30 μ l) bzw. Na-Cl-Lösung (10 μ l, 30 μ l) 5 Min. inkubiert bei Zimmertemperatur, dann wie gewohnt weiterverdünnt mit Trisimidazolpuffer
weiter nach $(T - T_0) - (P - P_0)$

	Pool	Patient mit Mastzellre- tikulose	Patient mit Herzinfarkt Heparinisiert
10 μ l NaCl	132	137	
30 μ l NaCl			250
10 μ l Protamin- sulfat	122	127	
30 μ l Protamin- sulfat		127	100

A-III-Aktivität

A-III Aktivität



A - III Aktivitätsänderung unter Einfluß v. Protaminsulfat

Es ist deutlich die Hemmwirkung von Protaminsulfat auf Heparin (Abfall der A-III-Aktivität von 250 % auf 100 %) zu sehen, wohingegen im nicht heparinisierten Plasma der durch Protaminsulfat bedingte Abfall der A-III-Aktivität gering ist und im Bereich des Variationskoeffizienten der Testmethode liegt.

Anwendung im chirurgisch-urologischen Bereich

Im Rahmen einer Studie über die "Blutgerinnungsänderungen nach transfemoraler Embolisation inoperabler Nierentumoren" (26) wurden verschiedene Parameter, insbesondere solche, die eine Hyperkoagulabilität quantifizieren können, nach der Embolisation mit oder ohne Heparin-Therapie untersucht. Hier wurde auch erstmals für eine klinische Studie die Antithrombin-III-Aktivität nach der neuen Methode mit dem chromogenen Substrat S-2160 bestimmt.

Zur Erfassung der Hyperkoagulabilität erschien eine quantitative Bestimmung der

- 1) löslichen Fibrinmonomer Komplexe (LFMK)
- 2) Antithrombin-III-Aktivität
- und 3) Faktor VIII- assoziierten Antigen -
besonders geeignet.

Krankengut und Methodik:

5 Patienten mit inoperablem Nierenkarzinom wurden einer transfemorale Embolisation mit autologem Muskelhomogenisat unterzogen.

Die Indikation hierfür war eine rezidivierende bzw. starke Hämaturie. Das Therapieziel, eine Stillung der Blutung, konnte in allen, eine Tumorverkleinerung in drei Fällen erreicht werden.

Bei den ersten beiden Kranken traten 4 bzw. 6 Wochen nach der Embolisation thrombotische Venenverschlüsse auf, worauf die folgenden Patienten heparinisiert wurden.

Zusammensetzung des Embolisationsgemisches:

5,15 ml Muskelhomogenisat (Ultra-Turrax-Mixer) in 0,9 %
10 ml 60 % Conray
4 ml Faktor XIII Konzentrat (Behring-Werke)
0,2 ml Aprotinin Trasylol^R (= 4000 KIE)

Testmethoden:

lösliche Fibrinmonomer-Komplexe (LFMK)
quantitativ durch Gelfiltration
Antithrombin-III-Aktivität: photometrisch: S - 2160

Ergebnis:

Vor der Embolisation waren bei allen Kranken die löslichen Fibrinmonomer-Komplexe (LFKMK) erhöht oder im oberen Normbereich.

Die Antithrombin-III-Aktivität lag im Normbereich.

Daraus ergaben sich Anhaltspunkte für eine schon vor dem Eingriff bestehende Hypoerkoagulabilität.

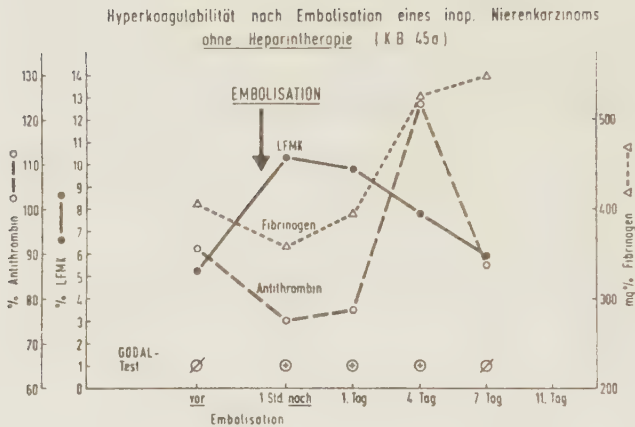


Abb. F.J. Marx et al. (26)

Die Abbildung zeigt einen für die nicht heparinisierten Patienten typischen Verlauf der wichtigsten Messwerte nach der Embolisation.

Deutlich ist der nach der Muskeleinschwemmung entstehende Abfall des Fibrinogens und der Antithrombin-III-Aktivität zu sehen.

Gleichzeitig steigt von einem hohen Ausgangsniveau der LFMK-Spiegel stark an.

Es kommt also zu einer weiteren Aktivierung der intravaskulären Gerinnung mit Anzeichen einer systemischen Verbrauchsreaktion.

Da bei nicht heparinisierten Patienten Thrombosen auftraten, wurden die anderen Kranken schon vor der Embolisation heparinisiert.

Der Verlauf der wichtigsten Parameter ist in folgender Abbildung dargestellt.

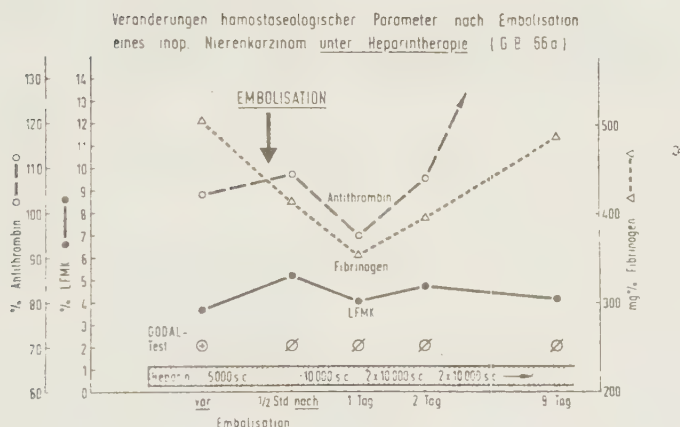


Abb. F.J. Marx et al. (26)

Im Gegensatz zum vorausgehenden Fall steigen hier die löslichen Fbrinmonomerkomplexe (LFMK) kaum an.

Der Fibrinogenspiegel fällt zwar ab, die Antithrombin-III-Aktivität bewegt sich aber im Normbereich und steigt schließlich heparinbedingt an.

Facit:

Eine ausgeprägte systemische Gerinnungsaktivierung kommt unter Heparintherapie nicht zustande, der Fibrinogenabfall kann durch lokalisierten Verbrauch im embolisierten Tumor bedingt sein.

Vergleichende Untersuchung der Thrombinzeit, A-III-Aktivität und Heparinkonzentration im Plasma

Im Frühjahr 1977 wurde von der Firma Kabi ein neuer Test angeboten, der mit Hilfe einer chromogenen Substanz die Heparinkonzentration in IU / ml Plasma zu bestimmen in der Lage ist.

Diesen Test einmal an einer Patientengruppe auszuprobieren, die gemessene Heparinkonzentration mit der A-III-Aktivität und der Thrombinzeit in Beziehung zu setzen war meine Aufgabe.

Methodik: Heparinbestimmungstest Kabi

Geräte:

Photometer 405 nm
Mikroküvetten
Wasserbad 37° C
Zentrifuge 2000xg
Stoppuhr
Einmalreagenzgläser

Reagenzien:

Konzentration der Lösung:

Substrat S-2222	1 mmol / l
Faktor Xa, bovine	8 Denson U/ml
Puffer pH 8,4	Tris 0,05 mol/l, EDTA 7,5mmol
Antithrombin III, human	1 U/ml
Normalplasma, human	
dest. Wasser	
Essigsäure 50 %	
physiol. Kochsalzlösung	
Heparin	

Bereitung des Plasmas:

9 Teile Blut werden mit 1 Teil Natriumcitrat (0,1 mol/l) gemischt, zentrifugiert bei 2000g für 20 Min. bei + 4° C. Während des Versuches wird das Plasma in Eiswasser aufbewahrt.

Bereitung des Heparins für die Standardkurve:

Käufliches Heparin wird mit physiologischer Kochsalzlösung herunterverdünnt auf 10 IU/ml.

100 µl dieser Heparinverdünnung werden mit 4,9 ml Puffer weiter verdünnt, bis eine Heparinkonzentration von 0,2 IU/ml erreicht ist.

Erstellung der Eichkurve:

Hep.IU/ml Plasma	Heparin 0,2 IU/ml	Puffer	A-III	Normalplasma
0	0 µl	800 µl	100 µl	100 µl
0,2	100 µl	700 µl	100 µl	100 µl
0,4	200 µl	600 µl	100 µl	100 µl
0,6	300 µl	500 µl	100 µl	100 µl
0,8	400 µl	400 µl	100 µl	100 µl

Es wird gut gemischt.

Je 200 µl davon werden in eine Probenküvette PK und in eine Blindwertküvette BK gegeben.

Weitere Schritte wie unten beschrieben.

Reihenfolge der Schritte		Küvette Nr. 1	
Normalplasma oder Testplasma	1	100	
(Aufbewahrung in Eiswasser)			
A-III (Aufbewahrung in Eiswasser)	μ l	100	
Puffer (Zi-temp.)	μ l	800	
Mischen und sofort zum nächsten Schritt übergehen			
		Küvette Nr. 2 PK	Küvette Nr. 3 BK
Lösung von Küvette Nr. 1	μ l	200	200
Inkubieren bei 37° C (3-4 Min.)			
FXa (Zi-Temperatur)	μ l	100	
Mischen			
Inkubieren bei 37° C exact	sec.	30	
Substrat (S-2222) 37° C	1	200	
Mischen			
Inkubieren bei 37° C exact	sec.	180	
Essigsäure 50 %	μ l	300	300
Sofort mischen			
dest. Wasser			300
Mischen			

Bestimmung von ΔE (PK-BK) in Photometer bei 405 nm. Die Färbung der Lösung ist höchsten 4 Stunden stabil.

Die vergleichende Untersuchung wurde an vier Patienten durchgeführt, die eine verlängerte Thrombinzeit aufweisen.

Bestimmt wurde zusätzlich die A-III-Aktivität (photometrisch S-2160) und die Heparinkonzentration nach der Kabi-Test-Methode.

Patient	Thrombinzeit normal 12,3	A-III-Aktivität S - 2160	Hep.-Konz. IU/ml Plasma Kabi-Test
A	15,5	100	0,4
B	17,6	140	0,7
C	21,5	240	0,6
D	33,2	300	0,7

Bei den Patienten B,C,D ist recht gut zu erkennen, daß der deutlich verlängerten Thrombinzeit eine über die Norm erhöhte A-III-Aktivität sowie eine hohe Heparinkonzentration des Plasmas entspricht.

Alle drei Tests lassen sich demnach gut für die Überwachung einer Heparintherapie einsetzen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über eine neue Art der Antithrombin-III Bestimmung berichtet.

Es handelt sich hierbei um eine photometrische Methode, die sich eines chromogenen Substrates bedient, von dem Thrombin ein gut messbares p-Nitroanilin abspaltet. Dieses Substrat S-2160 wird nach physikalisch-chemischen Gesichtspunkten charakterisiert, seine Wirkungsweise erklärt und Gedanken zu seiner Entwicklung erläutert.

Weiter wird Antithrombin vorgestellt. Es wird ein Überblick über die Entwicklung der Antithrombinforschung seit 1905 gegeben. Sein chemisches Verhalten, der Metabolismus und Wechselwirkungen mit Heparin werden dargestellt.

Die Methodik mit ihren Vor- und Nachteilen, die verwendeten Gerätschaften und Reagenzien und eine genaue Versuchsbeschreibung werden aufgezeichnet.

An einem Kollektiv gesunder Probanden wird ein Normalbereich abgegrenzt (76 % - 124 %), der mit Ergebnissen anderer Autoren verglichen wird.

An verschiedenen Problemstellungen wird die neue Methode ausprobiert.

Es wird mit ihrer Hilfe die Thrombinhemmwirkung verschiedener Inhibitoren ermittelt.

Der Einfluß von Heparin und A-III Konzentrat auf die A-III Aktivität wird aufgezeigt.

Zur Verlaufskontrolle einer Therapie mit A-III-Konzentrat an einem Patienten mit A-III Mangelsyndrom kann die photometrische A-III Bestimmung einen wertvollen Beitrag leisten.

An Patienten mit inoperablem Nierenkarzinom wurden nach transfemoraler Embolisation zur Beurteilung der Blutgerinnungsänderung verschiedene Parameter bestimmt, u.a. A-III nach der photometrischen S-2160 Methode.

Mit Hilfe eines neuen Testes der Firma Kabi wurde eine vergleichende Untersuchung der Thrombinzeit, A-III Aktivität und Heparinkonzentration im Plasma angestellt.

Autorenverzeichnis

- (1) ABILDGAARD, U.
 Highly purified antithrombin III with
 heparin cofactor activity by disc
 electrophoresis
 Scand.H.Clin.Lab.Invest.21,89,1968
- (2) ABILDGAARD, U., K. GRAVEM et.al.
 Assay of Progressive Antithrombin in Plasma
 Thromb.Diath.Haemorrh.24
 (1970) 224
- (3) ABILDGAARD, U., M.K.FAGERHOL, O.EGEBERG
 Comparison of Progressive Antithrombin
 Activity and the Concentrations auf Three
 Thrombin Inhibitors in Human Plasma
 Scand.J.Chin.Lab.Invest.26,349,1970
- (4) ASTRUP, T., S. DARLING
 Antithrombin and Heparin
 Acta.physiol.scand. 5: 13 (1943)
- (5) BERGSTRÖM, K., G.LAHNBORG
 The effect of major surgery, low doses of
 Heparin and thromboembolism on plasma Anti-
 thrombin. Comparison of immediate thrombin
 inhibiting capacity and the Antithrombin III
 content
 Thromb.Res. 1975, 6, 223-233

- (6) BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, P. OLSSON
 Studies on Thrombin Inactivation in Normal
 Plasma, Serum and Plasma Fractions, and its
 Relation to Heparin
 Thromb.et Diath.haemorrh.9,368,1963
- (7) BLOMBÄCK, M., B.BLOMBÄCK, et.al.
 The Assay of Antithrombin Using a Synthetic
 Chromogenic Substrate for Thrombin
 Thromb.Res. Vol.5,pp.621-632,1974
- (8) CHAN, V., T.K. CHAN
 Thrombos.Res. 15: 209 (1979)
- (9) COLLEN, D., S.S.SCHETZ, F. de COCK, E. HOLMER,
 M.VERSTRAETE
 Eur. J. Clin. Invest. 7: 27 (1977)
- (10) DANISHEFSKY, J., A. ZWEBEN, B. SLOMIANY
 The carbohydrate components in the action of
 Antithrombin III
 Thrombos.Haemostas. 38, 202 (1977)
- (11) DATA SHEET
 S-2160 A Chromogenic Substrate for Serine
 Proteases
 Ab Bofors, Sweden 1974
- (12) DATENBLATT S-2238
 Kabi-Diagnostika Nov. 1976

- (13) DENNY, G.P., G.R.MINOT
The origin of antithrombin
Amer.J.Physiol. 38: 233 (1915)
- (14) EXPOSÉ:
Antithrombin III (BIA - 003/76)
Med.Abteilung Behringwerke
- (15) FAGERHOL, M.K., U. ABILDGAARD
Immunological Studies on Human Antithrombin III
Scand.J.Haemat. 7 (10-17) 1970
- (16) GODAL, H.C., M.RYGH, K.LAAKE
Progressive Inactivation of Purified Factor VII by Heparin and Antithrombin III
Thromb.Res. 1974,5,773-775
- (17) HALLEN, A.
A Method for Measuring Antithrombin
Thromb.Diath.Haemorrh.8,56 (1962)
- (18) HEIMBURGER, N.
First Intern.Symp. on Tissue Factors in the Hemeostasis of the Coagulation-Fibrinolysis System
Florence, Mai 1967, p.353
- (19) HENSEN, A., E.A. LOELIGER
Antithrombin III
Thromb.Diath.haemorrh.Supp.1
ad Vol 9, 1963

- (20) KLEIN, P.D., W.H. SEEGERs
The nature of plasma antithrombin activity
Blood 5: 742 (1950)
- (21) LEWIS, J.H., D.WALTERS, P.DIDISHEIM, D.R.MERCHANT
Application of continuous flow electroforesis
to the study of the blood coagulation proteins
and the enzyme system
J.clin.Invest. 37: 1323 (1958)
- (22) LOELIGER, E.A., J.F.PH. HERS
Chronic antithrombinaemia with haemorrhagic
diathesis in a case of rheumatoid arthritis
with hypergammaglobulinaemia
Thromb.Diath.Haemorrh.1:499(1957)
- (23) LYTTLETON, J.W.
The antithrombin activity of heparin
Biochem J.58: 15 (1954)
- (24) LYTTLETON, J.W.
The antithrombin activity of human plasma
Biochem. J.58: 8 (1954)
- (25) MARKWARDT, F., P. WALSMANN
Untersuchungen über den Mechanismus der
Antithrombinwirkung des Heparin
Hoppe Seylers Z.phys.Chem.
317, 64 (1959)
- (26) MARX, F.J., W. SCHRAMM, R. HAFTER, F. EISENBERGER
Blutgerinnungsveränderungen nach transfemoraler
Embolisation inopërabler Nierentumoren
Helv.chir.Acto 44,385-389 (1977)

- (27) MARX, R. et.al.
Über einige Entwicklungs-Ansatzpunkte über
Direktantithrombine als Antithrombotika
- (28) MIHALYI, E.
Observations on thrombin inactivation by
human serum
H.gen.Physiol.37:139 (1954)
- (29) MORAWITZ, P.
Die Chemie der Blutgerinnung
Ergebn.Physiol. 4:307 (1905)
- (30) ØDEGARD, O.R., U. ABILDGAARD, MEDICAL DEPT.A,
AKER HOSPITAL OSLO 5, NORWAY
Determination of Antithrombin III and
Antifactor Xa Activity
- (31) ØDEGARD, O.R., M. LIE, U. ABILDGAARD
Heparin Cofactor Activity measured with an
Amidolytic Method
Thromb.Res. 1975, 6, 287-294
- (32) ØDEGARD, O.R., A.N. TEIEN
Antithrombin III, Heparin Cofactor and
Antifactor Xa in a clinical material
Thromb.Res.1976,8,173-178
- (33) ORTHO-DIAGNOSTICS 1977
631 - 20 - 931 - 2

- (34) PETERSEN, T.E., G. DUDEK-WOJCIECHOWSKA,
L. SOTTRUP-JENSEN, S. MAGNUSSON
The primary structure of Antithrombin III
Thrombos.Haemostas,38,201 (1977)
- (35) QUICK, A.J.
The normal antithrombin of the blood and
its relation to heparin
Amer.J.Physiol. 123: 712 (1938)
- (36) RÓKA, L.
Antithrombin
Diagnostica:Boehringer Mannheim 1977
- (37) ROSENBERG, R.D.
The Effect of Heparin on Factor XIa and
Plasmin
Thrombos.Diathes.Haemorrh.
(Stuttg.) 1974, 33, 51-62
- (38) ROSENBERG, R.D.
Actions and Interactions of Antithrombin
and Heparin
The New England Journal of
Medicine, January 16, 1975
- (39) ROSENBERG, R.D., P.S. DAMUS
The Purification and Machanism of Action
of Human Antithrombin-Heparin Cofaktor
J.Biol.Chem.248, 6490 (1973)
- (40) SEEGER, W.H., M. NIEFT, E.C. LOOMIS
Note on the adsorption of thrombin and fibrin
Science 101: 520 (1945)

- (41) SEEGER, W.H.
A new Plasma Antithrombin Reaction
Arch.Biochem.Biophys. 36:484 (1952)
- (42) SEEGER, W.H., K.D. MILLER, E.B. ANDREWS,
R.C. MURPHY
Fundamental interactions and the effect of
storage, ether, adsorbants and blood clotting
plasma Antithrombin activity
Amer.J.Physiol. 169:700 (1952)
- (43) SEEGER, W.H., J.F. JOHNSON, C. FELL
An antithrombin reaction related to prothrombin
activation
Amer.H.Phys. 176: 97 (1954)
- (44) SOKAL, G.
Die Bestimmung der Antithrombinaktivitäten
des Plasmas
Acta.haemat.14: 34 (1955)
- (45) SVENDSEN, L., B. BLOMBÄCK, et.al.
Synthetic Chromogenic Substrates for
Determination of Trypsin, Thrombin and
Thrombin-Like Enzymes
Thromb.Res.Vol.1,pp.267-278, 1972
- (46) TEIEN, A.N., M.L. & U. ABILDGAARD
Assay of Heparin in Plasma Using a
Chromogenic Substrate for Activated Factor X
Thromb.Res.Vol.8,pp.413-416, 1976
- (47) VINAZZER, H.
Photometric Assay of Antithrombin III
with a Chromogenic Substrate
Haemostasis 4: 101-109 (1975)

- (48) VOGEL, CH.N., H.S. KINGDON, R.L. LUNDBLAD

In vitro Characterization of rabbit Thrombin,
Antithrombin III, and Thrombin-Antithrombin III
complex, and determination of their survival
times in vivo

Thrombos.Haemostas. 38,119 (1977)
Abstr.VIIInt.Cong.Thromb.Haemost.

- (49) WEYMOUTH, F.W.

The relation of methathrombin to thrombin
Amer.J.Physiol. 32, 266 (1913)

- (50) ZAMAN, C.L.

Fibrinolysis na longresectie
Thesis (Amsterdam 1961)

- (51) ZUCK, T.F., J.J. BERGIN et.al.

Implications of Depressed Antithrombin III
Activity Associated with oral Contraceptives
Surg.Gynec.Obstet.133,609, 1971

Für die Überlassung des Themas danke ich
Herrn Prof. Dr. med. R. Marx.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. W. Schramm
für die Betreuung bei der Erstellung dieser
Arbeit.

L e b e n s l a u f

Jürgen Zeller

8954 Biessenhofen-Ebenhofen, Ahornstr. 16

Landkreis Ostallgäu, Schwaben

geboren: 14.1.1950 in Holzkirchen/Obb.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Herbert Zeller
Ilse Zeller, geb. Buchholz

Ausbildung:

Volksschule: 1956 - 1960 in Augsburg

Gymnasium: neusprachl.-nat.-Gymnasium
1960 - 1969

Apothekerpraktikum: 1969 - 1971 in Augsburg

tätig als Apotheker-
assistent: 1971 - 1972

Studium:

Medizin: WS 1972 - WS 1978

Approbation: 11.5.1979

Seit 1.8.1979 bin ich als Assistenzarzt auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Marktoberdorf, Chefarzt Dr. med. W. Rademacher, tätig.

